

牛血清白蛋白修饰毛细管整体柱的制备 及组氨酸对映体分离

朱桃玉, 伍品端, 左娜娜, 吴京洪, 马志玲
(中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

摘要 以甲基丙烯酸缩水甘油酯为单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 环己醇和正十二醇混合溶液为致孔剂, 在最佳聚合条件下, 以偶氮二异丁腈为引发剂, 制备了毛细管整体柱基质, 并且研究了单体、交联剂及致孔剂对整体柱基质孔结构及渗透性的影响; 使用 Epoxy 方法在基质表面键合 BSA, 制得 BSA 修饰的毛细管整体柱. 将此毛细管整体柱应用于毛细管电色谱中, 成功地分离出了组氨酸对映体, 分离度良好.

关键词 毛细管整体柱; 牛血清白蛋白; 组氨酸对映体

中图分类号 O657.8 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2007)03-0427-04

毛细管电色谱(Capillary electrochromatography, CEC)是利用电渗流或电渗流结合压力作驱动力的微分离分析方法, 该方法结合了毛细管电泳和高效液相色谱两种分离机制, 具有快速、高效及使用范围广等优点. 传统的毛细管电色谱柱的填充和柱塞烧结过程繁琐, 柱容量和峰容量偏低. 近年来, 基于原位反应制备聚合物基质^[1,2]或硅胶基质^[3]的 CEC 整体柱可显著克服上述缺点^[3,4], 若在基质表面进行物理涂覆或化学修饰^[5]可实现手性物质的分离分析. Chen 等^[6]在硅胶整体柱上键合 *L*-苯丙酰胺, 在配体交换模式下成功地拆分了 12 对丹酰化氨基酸消旋体. Hosoya 等^[7]制备了具有环氧基单体和胺的聚合物整体柱, 在反相方式下分离乙醇对映体. Messina 等^[8]以原位聚合方法制备了甲基丙烯酸缩水甘油酯-乙二醇二甲基丙烯酸酯聚合整体柱基质, 通过对甲基丙烯酸缩水甘油酯表面进行环氧基化学修饰, 制成手性固定相, 从而对 2-苯氧基丙酸对映体进行了分离. 本实验以甲基丙烯酸缩水甘油酯(Glycidyl methacrylate, GMA)为单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯(Ethylene glycol dimethacrylate, EDMA)为交联剂, 环己醇(Cyclohexanol, CyOH)和正十二醇(Dodecanol, DoOH)混合溶液为致孔剂, 偶氮二异丁腈(Azo-bis-iso-butyronitrile, AIBN)为引发剂, 热引发原位聚合制备了毛细管 GMA/EDMA 聚合物整体柱基质^[9,10]. 然后采用 Epoxy 方法^[11], 在整体柱基质表面键合牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA), 获得 BSA 修饰的毛细管整体柱, 并将其成功地用于组氨酸对映体的分离, 分离度良好.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CES2003 毛细管电泳仪(中山大学化学与化学工程学院电化学分析研究室研制, 配有高压电源、电导检测器及毛细管电泳数据工作站); JSM-6330F 场发射扫描电子显微镜(日本电子株式会社); 氮吸附比表面积及孔径分布分析仪(Micromeritics 公司, 美国); Vector 22 FTIR 光谱仪(Bruker 公司, 德国); Shimadzu LC-20AT 液相泵(日本岛津公司); SDC-6 低温恒温槽(宁波海曙赛福实验仪器厂); PHS-25 型 pH 计(上海雷磁仪器厂); 融石英毛细管(100 μm i. d., 河北永年光导纤维厂).

甲基丙烯酸缩水甘油酯(纯度 $\geq 97.0\%$, 德国 Fluka 化学试剂公司), 乙二醇二甲基丙烯酸酯(纯度 $\geq 97.0\%$, 德国 Fluka 化学试剂公司), 环己醇(化学纯, 中国医药集团上海化学试剂公司), 十二醇(分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心), 偶氮二异丁腈(分析纯, 天津市福晨化学试剂厂), 牛血

收稿日期: 2006-10-12.

基金项目: 中山大学化学与化学工程学院第六届创新研究基金(批准号: 200608)资助.

联系人简介: 马志玲(1963 年出生), 女, 硕士, 副教授, 主要从事色谱分离技术研究. E-mail: cesmzl@mail.sysu.edu.cn

清白蛋白(分析纯, Goodteam Chemical Supplies, 用 67 mmol/L pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液配制成 4 mg/mL BSA 溶液), *D,L*-型组氨酸(生化试剂, 中国科学院上海生物化学研究所), 磷酸(分析纯, 广州化学试剂厂), 磷酸氢二钾(分析纯, 汕头市西陇化工厂), 无水甲醇(分析纯, 广州化学试剂厂), 三羟甲基氨基甲烷乙酸盐(分析纯, Facro Chemical Supplies), 实验用水均为超纯水.

1.2 实验过程

依次用 1.0 mol/L NaOH、超纯水、0.1 mol/L HCl、超纯水及无水甲醇冲洗毛细管内壁后, 用 N_2 气吹干备用. 取 1 支 5 mL 试管, 按比例依次加入 GMA, EDMA, CyOH 和 DoOH, 混合均匀, 加入质量分数为 1% 的 AIBN; 将上述混合物超声 10 min 后, 通入 N_2 气 10 min; 用注射器将反应液注入到预先处理好的毛细管中($l=40$ cm), 将毛细管两端封好, 并置于 60 °C 水浴中反应 24 h. 聚合反应完成后, 将毛细管接至 LC-20 AT 输液泵, 依次用无水甲醇、超纯水和 67 mmol/L pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗, 泵入 4 mg/mL 的 BSA 溶液反应 24 h; 通入 50 mmol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液进行封尾处理; 最后用超纯水和 67 mmol/L pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗, 封口, 保存于冰箱(4 °C)中备用. 将 BSA 修饰毛细管整体柱接至 CES2003 毛细管电泳仪, 在 7.0 kV 操作电压下, 使用电导检测器, 以 2 mmol/L pH = 5.5 的磷酸缓冲溶液为电解质溶液, 采用重力进样, 进样时间 5 s, 信号采集时间 20 min, 电导检测器的输出信号经数据工作站采集并导入微机中进行实时处理, 分离 *D,L*-组氨酸对映体.

2 结果与讨论

2.1 整体柱基质的制备及其影响因素

CEC 的驱动力是电渗流, 其对毛细管整体柱基质的刚性要求不高, 可通过基质表面活性环氧基团含量、基质的孔结构及毛细管整体柱的渗透性来评价基质的性能. 影响整体柱基质性能的主要因素包括致孔剂、单体和交联剂用量及聚合温度等.

2.1.1 致孔剂对毛细管整体柱基质性能的影响 在共聚反应过程中, 致孔剂的比例对基质的微观形态和孔结构有较大的影响, 进而影响毛细管整体柱分离性能.

在 60 °C 聚合温度下, 固定 $V(\text{GMA})/V(\text{EDMA})$ 为 3:2, GMA 和 EDMA 的总体积为 40%, 考察 $V(\text{CyOH})/V(\text{DoOH})$ 分别为 1:5, 1:1 和 5:1 时对基质的孔结构及毛细管整体柱的渗透性影响. 将合成长度相等的毛细管整体柱接至 LC-20AT 输液泵, 设定流速(v), 记录整体柱的背压(p), 计算 v/p 值, 根据此数值的大小判断毛细管整体柱的渗透性, 结果见图 1. 另外, 还通过场发射扫描电镜来观察基质的孔结构, 结果如图 2 所示.

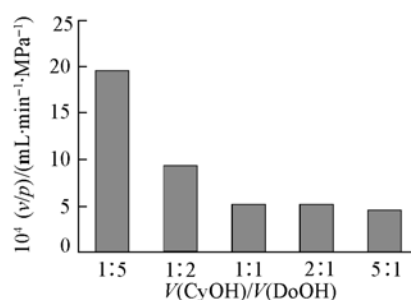


Fig. 1 Effect of porogen composition on the osmosis of capillary monolith matrices

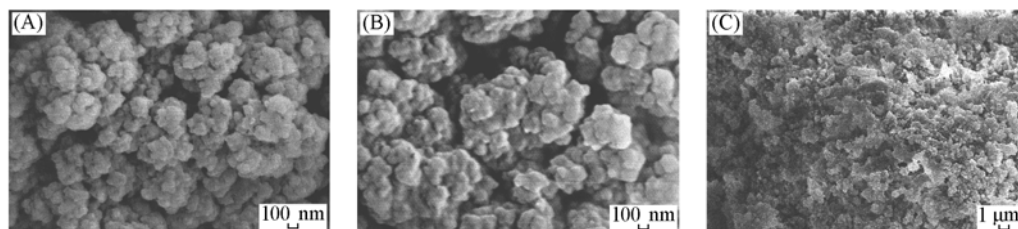


Fig. 2 Scanning electron micrographs of capillary monolith matrices

$V(\text{CyOH})/V(\text{DoOH})$: (A) 1:5, (B) 1:1, (C) 5:1, respectively.

从图 1 可以看出, 当 $V(\text{CyOH})/V(\text{DoOH})$ 从 1:5 升高到 5:1 时, v/p 值迅速减小, 即毛细管整体柱基质的渗透性迅速降低. 这不仅使基质的进一步修饰变得困难, 而且导致 CEC 实验中电流过小, 不利于分离. 图 2 也显示, 当 $V(\text{CyOH})/V(\text{DoOH})$ 为 1:1, 1:5 和 5:1 时, 基质的孔径大小依次减小, 且 1:5 时的基质孔径分布最均匀. 因此, 致孔剂中 DoOH 用量越大, 整体柱基质孔径越大, 其渗透性增强. 本

实验选择 $V(\text{CyOH})/V(\text{DoOH})$ 为 1:5.

2.1.2 GMA/EDMA 用量比对毛细管整体柱基质渗透性及环氧基团含量的影响 在 60 °C 的聚合温度下, 固定 $V(\text{CyOH})/V(\text{DoOH})$ 为 1:5, 致孔剂总体积分数为 60%, 考察 $V(\text{GMA})/V(\text{EDMA})$ 比对毛细管整体柱渗透性的影响. 将合成的 3 根长度相同的毛细管整体柱接至 LC-20AT 输液泵, 设定流速(v), 记录毛细管整体柱的背压(p), 计算 v/p 值, 根据此数值的大小判断毛细管整体柱的渗透性, 实验结果见图 3. 从图 3 可以看出, 随着 EDMA 用量的增加, v/p 值逐渐减小, 整体柱基质的渗透性变差. 这是由于随着交联剂用量的增加, 聚合反应初期所形成的核与小液滴的数目增加的原因. 在系统中单体数量相等的前提下, 液滴越小, 液滴被冲洗后留下的孔越小, 则整体柱的渗透性越差.

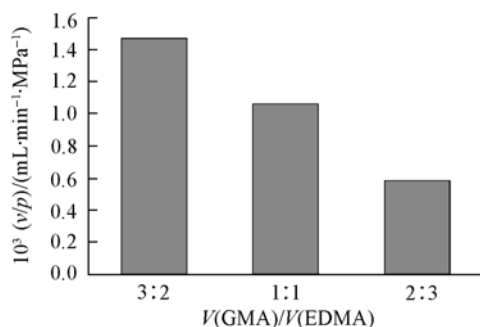


Fig. 3 Effect of $V(\text{GMA})/V(\text{EDMA})$ on the osmosis of capillary monolith matrixes

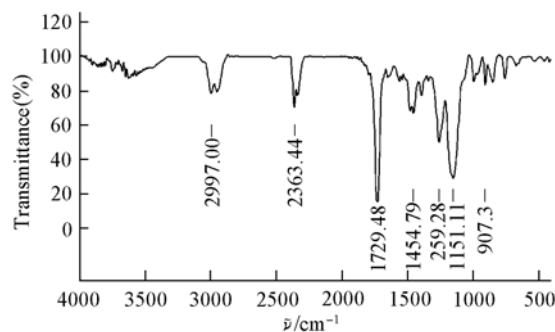


Fig. 4 IR spectrum of the monolith matrixes before modifying

此外, 为了考察 GMA 用量对整体柱基质表面活性环氧基团含量的影响, 将待修饰的整体柱基质冷冻干燥后研细, 压片, 测定红外光谱(图 4). 根据整体柱基质的红外光谱可知, 1730 和 1150 cm^{-1} 分别为酯基的 >C=O 的伸缩振动及 C-O-C 的非对称伸缩振动吸收峰, 908 cm^{-1} 则确认了基质中活

性环氧基团 -C-O-C- 的存在. 在 930 ~ 888 cm^{-1} 范围内确定基线的基础上, 积分 908 cm^{-1} 环氧基团吸收峰峰面积以衡量环氧基团的量; 在 1791 ~ 1687 cm^{-1} 基线范围内, 积分 1730 cm^{-1} 羰基吸收峰峰面积以衡量 GMA 和 EDMA 的总量, 并计算其比值. 根据此值可定量地评估活性环氧基团相对于整体柱基质的含量, 以此研究 GMA 用量对基质表面活性环氧基团的影响. 由表 1 可见, 随着 $V(\text{GMA})/V(\text{EDMA})$ 的增大, 基质中活性环氧基团的含量逐渐增大.

Table 1 Comparison of peak area of epoxy group with that of ester group

$V(\text{GMA})/V(\text{EDMA})$ (%)	Epoxy group	Ester group	Specific value
24	33.4055	59.3904	0.5625
20	26.8072	49.1596	0.5453
16	26.3245	53.5184	0.4919

实验结果表明, EDMA 用量越高, 在基质中形成大孔通道越难, 从而使得毛细管整体柱基质的渗透性变差; 同时, 在单体用量一定的情况下, EDMA 用量越高, 则基质表面活性环氧基团含量越低, 不利于基质的进一步修饰; 相反, 若 EDMA 用量过低, 则基质的机械性能变差. 综合考虑毛细管整体柱的渗透性和基质中活性环氧基团的含量, 本实验选择 $V(\text{GMA})/V(\text{EDMA})$ 比为 3:2.

2.1.3 氮吸附法测定整体柱基质孔径大小分布 将待修饰的整体柱基质冷冻干燥, 用氮吸附法测定其孔径大小分布. 从图 5 可以看出, 整体柱基质孔径主要分布在 50 ~ 100 nm 范围内, 中孔和大孔居多, 未发现小于 2 nm 的微孔, 用 BET 方法测出该基质的表面积为 3.8 m^2/g .

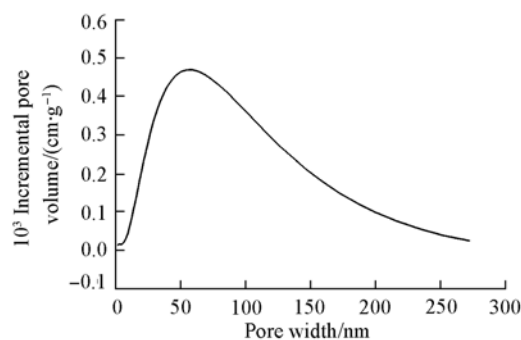


Fig. 5 Pore size distribution of the monolith matrixes measured by nitrogen adsorption

2.2 BSA 修饰 CEC 整体柱的制备

BSA 的等电点为 4.7, 在 pH = 5 ~ 9 范围内稳定, 且具有不同的手性作用中心和空间识别能力, 是一种较好的手性试剂. 本实验使用 Epoxy method, 即通过 BSA 中的氨基对基质表面的活性环氧基团直接亲核进攻固载在基质上, 得到 BSA 修饰整体柱. 该方法操作简单, 易于实施, 适用于在 GMA/EDMA 基质表面键合蛋白^[11]. 为消除固载 BSA 后基质表面残留的活性环氧基团与待分离物质发生共价结合, 本实验使用 50 mmol/L pH = 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液封闭残留的环氧基团.

2.3 BSA 修饰 CEC 整体柱分离组氨酸对映体

在选定的条件下制备 1 根 40 cm 长的 BSA 修饰毛细管整体柱, 在研究缓冲溶液浓度及 pH 值对分离 *D,L*-型组氨酸对映体的影响基础上, 选择了最佳分离条件; 以 2 mmol/L pH = 5.5 的磷酸缓冲溶液作为电解质溶液, 对质量浓度为 25 mg/L 的 *D,L*-型组氨酸对映体进行拆分. 从图 6 可以看出, 使用自制的 BSA 修饰毛细管整体柱, 在最佳实验条件下, 组氨酸对映体得到较好的分离, 分离度大于 1.2. 分离度的 RSD 为 7.07%. 该 BSA 修饰毛细管整体柱在 4 °C 条件下保存 3 个月, 性能未发生改变.

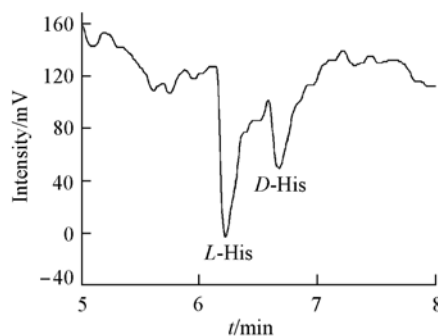


Fig. 6 Chromatogram of separation of *D,L*-histidine enantiomers by BSA capillary monolith

参 考 文 献

- [1] Mohamed Bedair, Ziad El Rassi. *J. Chromatogr. A*[J], 2004, **1044**: 177—186
- [2] Jiang T., Jiskra J., Claessens H. A., *et al.*. *J. Chromatogr. A*[J], 2001, **923**: 215—227
- [3] Kang J., Wistuba D., Schurig V.. *Electrophoresis*[J], 2002, **23**: 4005—4021
- [4] Legido-Quigley C., Marlin N. D., Melin V., *et al.*. *Electrophoresis*[J], 2003, **24**: 917—944
- [5] Kang J., Wistuba D., Schurig V.. *Electrophoresis*[J], 2002, **23**: 1116—1120
- [6] Chen Z., Hobo T.. *Anal. Chem.* [J], 2001, **73**: 3348—3357
- [7] Hosoya K., Hira N., Yamamoto K., *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 2006, **78**(16): 5729—5735
- [8] Messina A., Flieger M., Bachechi F., *et al.*. *J. Chromatogr. A*[J], 2006, **1120**(1/2): 69—74
- [9] Josic D., Reusch J., Loester K., *et al.*. *J. Chromatogr. A*[J], 1992, **590**: 59—76
- [10] Kasper C., Meringova L., Freitag R., *et al.*. *J. Chromatogr. A*[J], 1998, **798**: 65—72
- [11] Mallik Rangan, Jiang Tao, Hage David S.. *Anal. Chem.* [J], 2004, **76**: 7013—7022

Preparation of Bovine Serum Albumin Capillary Monolith for the Separation of Histidine Enantiomers

ZHU Tao-Yu, WU Pin-Duan, ZUO Na-Na, WU Jing-Hong, MA Zhi-Ling*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract A series of monolithic capillary columns were prepared by copolymerization of GMA and EDMA in the presence of a porogenic solvent containing cyclohexanol and *n*-dodecanol. The influences of the contents of the porogenic solvent and GMA on the monolith morphology and osmosis were investigated. The capillary monolith matrixes were prepared under the optimized conditions, and BSA capillary monoliths were gained by epoxy method using BSA as the model ligand. The BSA capillary monolith coupled with capillary electrochromatography was developed for the separation of *D,L*-histidine, and showed a good result.

Keywords Capillary monolith; Bovine serum albumin; Histidine enantiomer

(Ed.: A, G)